

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-51997

(43)公開日 平成8年(1996)2月27日

(51)Int.Cl.⁶

C 1 2 Q 1/28

識別記号

庁内整理番号

6807-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 5 頁)

(21)出願番号 特願平6-161638

(22)出願日 平成6年(1994)7月14日

(31)優先権主張番号 特願平6-127186

(32)優先日 平6(1994)6月9日

(33)優先権主張国 日本 (J P)

(71)出願人 000004455

日立化成工業株式会社
東京都新宿区西新宿2丁目1番1号

(72)発明者 岩田 理子

茨城県日立市東町四丁目13番1号 日立化
成工業株式会社医薬品研究所内

(72)発明者 林 隆志

茨城県日立市東町四丁目13番1号 日立化
成工業株式会社医薬品研究所内

(72)発明者 山木 光男

茨城県日立市東町四丁目13番1号 日立化
成工業株式会社医薬品研究所内

(74)代理人 弁理士 若林 邦彦

(54)【発明の名称】 化学発光測定試薬及び化学発光測定方法

(57)【要約】

【構成】 酵素としてペルオキシダーゼを用い、化学発光基質、酸化剤及び増感剤を用いる化学発光反応により、酵素の活性を検出・定量する測定試薬であって、化学発光基質、酸化剤及び増感剤を①酸化剤溶液、②化学発光基質・増感剤混液の2液として保存してなる化学発光測定試薬並びにこの試薬を用いる化学発光測定方法。

【効果】 この化学発光測定試薬は、試薬キットの構成が簡素化されると共に保存安定性に優れる。また、この測定試薬を用いる化学発光測定方法は、発光量が高く、高感度の測定が可能である。従って、酵素免疫測定法、DNAプローブ法等による生体微量成分の定量・分析等、臨床検査や臨床化学の分野で広範囲に利用できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 酵素としてペルオキシダーゼを用い、化学発光基質、酸化剤及び増感剤を用いる化学発光反応により、酵素の活性を検出・定量する測定試薬であって、化学発光基質、酸化剤及び増感剤を①酸化剤溶液、②化学発光基質・増感剤混液の2液として保存してなる化学発光測定試薬。

【請求項2】 化学発光基質がルミノール類である請求項1記載の化学発光測定試薬。

【請求項3】 酸化剤が過酸化水素である請求項1又は2記載の化学発光測定試薬。

【請求項4】 酵素としてペルオキシダーゼを用い、化学発光基質、酸化剤及び増感剤を用いる化学発光反応により、酵素の活性を検出・定量する測定方法であって、予め①酸化剤溶液、②化学発光基質・増感剤混液の2液を調製し、ペルオキシダーゼを含む反応系に、①酸化剤溶液、②化学発光基質・増感剤混液の順に添加することを特徴とする化学発光測定方法。

【請求項5】 酵素としてペルオキシダーゼを用い、化学発光基質、酸化剤及び増感剤を用いる化学発光反応により、酵素の活性を検出・定量する測定方法であって、予め①酸化剤溶液、②化学発光基質・増感剤混液の2液を調製し、これらを別々にかつ同時にペルオキシダーゼを含む反応系に添加することを特徴とする化学発光測定方法。

【請求項6】 酵素としてペルオキシダーゼを用い、化学発光基質、酸化剤及び増感剤を用いる化学発光反応により、酵素の活性を検出・定量する測定方法であって、予め①酸化剤溶液、②化学発光基質・増感剤混液の2液を調製し、使用直前にこれらを混合して、ペルオキシダーゼを含む反応系に添加することを特徴とする化学発光測定方法。

【請求項7】 化学発光基質がルミノール類である請求項4、5又は6記載の化学発光測定方法。

【請求項8】 酸化剤が過酸化水素である請求項4、5、6又は7記載の化学発光測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、生物学的に特異的な結合反応、例えば抗原抗体反応の検出・定量等に有用な化学発光測定試薬及び化学発光測定方法に関する。特に、臨床検査及び臨床化学の分野等で生体微量成分の高感度な分析・定量に有用な化学発光測定試薬及び化学発光測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】測定対象物質を高感度に検出・定量するために、抗原、抗体、受容体等の特異的捕捉剤を用いた特異的な結合反応を利用することが知られており、代表的な測定方法にサンドイッチ型免疫測定法が知られている。前記結合反応の検出物質としては、ラジオアイソ

トープ、酵素、蛍光性物質、発光性物質等を利用することができる。これらのうち、酵素を検出物質として用いる免疫測定法（EIA）は、ラジオアイソトープを用いる免疫測定法（RIA）のような危険性はなく、特異的な結合反応を増幅することができ、一般にその酵素の触媒活性を定量することによって、特異的に結合した測定対象物質量を間接的に測定することができるため、広く用いられている。酵素としてペルオキシダーゼを使用し、この酵素活性をルミノール及び過酸化水素による化学発光反応を利用して測定する方法は、通常発光が短寿命であるが、増感剤の添加により、発光量の増加及び発光持続時間の長期化が図れ、この反応を用いるとRIAに匹敵する高感度な測定が可能となることが知られている。そのために種々の増感剤が検討されている（特開昭59-171839号公報、特表昭59-500252号公報、特開平2-291299号公報等）。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】試薬の構成及び反応時の混合順序として、上記特開昭59-171839号公報、特表昭59-500252号公報等には、ペルオキシダーゼ、ルミノール、増感剤及び酸化剤の4つを別々の試薬として保存し、反応時に混合してルミネセンス反応を開始させることが記載される。さらに具体的には、使用の数時間前にルミノールと過酸化水素を混合して溶液を調製し、これを増感剤を予め加えた、ペルオキシダーゼ抗体複合体を含む反応系に注入して反応を開始させる方法が記載されている。また、上記特開平2-291299号公報等には、ルミノールと過酸化水素水を使用の約2時間前に混合し、使用直前にさらに増感剤を加えて混合した混合液を、反応系に添加する方法が記載されている。一般に、これらの化学発光反応を利用する測定方法が適用される測定対象物質は超微量であることが多々有り、上記各方法で充分ということはなく、さらに高感度でかつ安定な測定法及び保存安定性の高い試薬の開発が望まれている。本発明は、これらの課題を解決するものであり、試薬の構成及び添加順序の点から、鋭意検討を行った結果なし得た、さらに高感度でかつ安定な測定方法及び保存安定性が高くかつ試薬キットの簡素化も図れる測定試薬及び測定方法を提供するものである。

【0004】

【課題を解決するための手段】即ち本発明は、下記の（1）～（4）に関する。

（1）酵素としてペルオキシダーゼを用い、化学発光基質、酸化剤及び増感剤を用いる化学発光反応により、酵素の活性を検出・定量する測定試薬であって、化学発光基質、酸化剤及び増感剤を①酸化剤溶液、②化学発光基質・増感剤混液の2液として保存してなる化学発光測定試薬。

（2）酵素としてペルオキシダーゼを用い、化学発光基質、酸化剤及び増感剤を用いる化学発光反応により、酵

素の活性を検出・定量する測定方法であって、予め①酸化剤溶液、②化学発光基質・増感剤混液の2液を調製し、ペルオキシダーゼを含む反応系に、①酸化剤溶液、②化学発光基質・増感剤混液の順に添加することを特徴とする化学発光測定方法。

(3) 酵素としてペルオキシダーゼを用い、化学発光基質、酸化剤及び増感剤を用いる化学発光反応により、酵素の活性を検出・定量する測定方法であって、予め①酸化剤溶液、②化学発光基質・増感剤混液の2液を調製し、これらを別々にかつ同時にペルオキシダーゼを含む

反応系に添加することを特徴とする化学発光測定方法。
(4) 酵素としてペルオキシダーゼを用い、化学発光基質、酸化剤及び増感剤を用いる化学発光反応により、酵素の活性を検出・定量する測定方法であって、予め①酸化剤溶液、②化学発光基質・増感剤混液の2液を調製し、使用直前にこれらを混合して、ペルオキシダーゼを含む反応系に添加することを特徴とする化学発光測定方法。

【0005】本発明における化学発光測定試薬及び化学発光測定方法は、酵素としてペルオキシダーゼを用い、酵素活性の検出・定量に化学発光基質、酸化剤及び増感剤を用いるものであれば、測定対象及び測定手法に特に制限はない。例えば、ペルオキシダーゼを標識酵素として用いる特異的結合反応系として、酵素免疫測定法の一抗体法、二抗体法、競合分析法、サンドイッチ分析法、ホモジーニクス分析法、ヘテロジーニクス分析法、ウエスタン分析法、DNAプローブ法等の各種分析法に利用できる。

【0006】本発明で用いられるペルオキシダーゼは特に限定するものではないが、西洋ワサビペルオキシダーゼの塩基性アイソザイムが増感剤との組合せにより、高い特異発光量が得られる点から好適である。西洋ワサビペルオキシダーゼの塩基性アイソザイムにはB、C、D及びEの各型が知られているが、これらの中ではC型がRZ値（ヘミンとタンパク質の比を示す）及び酵素活性の点で最も好ましい。これは、例えば東洋紡（株）から市販され入手可能である。

【0007】化学発光反応に用いる化学発光基質としては、ルミノール類、ルシゲニンなどがあるが、ルミノール類が好ましく、具体的には、ルミノール、イソルミノール、N-エチルイソルミノール、N-(4-アミノブチル)-N-エチルイソルミノールヘミサクシミド、N-(6-アミノヘキシル)-N-エチルイソルミノール等が挙げられる。中でもルミノール又はイソルミノールが好ましく、特にルミノールが好ましい。ルミノールは、通常入手できる試薬グレードのものには、製造原料であるヒドラジン及び硫化物イオンが混入している場合が多いので、再結晶を繰返し精製したものをを用いるのが好ましい。

【0008】化学発光反応に用いる酸化剤としては、過

酸化水素、過硼素酸塩、過酸化尿素などが挙げられるが、過酸化水素が好ましい。化学発光反応に用いる増感剤は、増発光効果や発光持続性効果のあるものであれば特に限定するものではないが、p-ヨードフェノール、p-ブロムフェノール、フェノールインドフェノール、4-[4'-(2'-メチル)チアゾリル]フェノール等のフェノール誘導体、6-ハイドロキシベンゾチアゾール、4-(4-ハイドロキシフェニル)チアゾール等のベンゾチアゾール誘導体、3-(10-フェノチアジール)-プロピルスルホン酸塩、p-ヒドロキシフェニルプロピオン酸、ジエチルアニリン等が好ましいものとして用いられる。特に好ましいものは、S/N比（シグナルとノイズの比）が高い点で4-[4'-(2'-メチル)チアゾリル]フェノールである。

【0009】本発明の化学発光測定試薬は、化学発光に関与する物質を①酸化剤溶液、②化学発光基質・増感剤混液の2液として保存してなる。このように保存すると、従来のような化学発光基質を①酸化剤溶液、②化学発光基質溶液、③増感剤溶液の3液系として保存する必要がないので、試薬キットの構成を簡素化でき、測定機器付属の自動分注装置に適用できる試薬数が少ない場合は便利である上、保存安定性も3液系と同等以上であり、優れる場合もある。酸化剤溶液は安定性又は発光反応のS/N比を高めるために、緩衝液に防腐剤や界面活性剤やタンパク質等を添加した溶液を溶媒として用いるのが好ましい。酸化剤の濃度は、高発光が得られ、基質阻害がかからない濃度であれば特に限定するものではないが、溶液中0.1~1.0mMが好ましい。化学発光基質・増感剤溶液は、安定した発光を得るためにpH8~13のアルカリ性であることが好ましい。増感剤濃度は、S/N比の高い発光が得られれば特に限定するものではないが、溶液中0.01~5mMの範囲が好ましい。発光基質濃度は高発光が得られ、基質阻害がかからない濃度であれば特に限定するものではないが、溶液中0.01~50mMの範囲が好ましい。

【0010】本発明の化学発光測定方法は、予め化学発光に関与する物質を①酸化剤溶液、②化学発光基質・増感剤混液の2液として調製し、(a)ペルオキシダーゼを含む反応系に、①の溶液、②の混液の順に添加するか、(b)①の溶液及び②の混液を、別々にかつ同時にペルオキシダーゼを含む反応系に添加するか、(c)①の溶液及び②の混液の2液を使用直前に混合して、ペルオキシダーゼを含む反応系に添加するものである。これらの方法をとることにより、従来の方法に比べて化学発光量の大きい、高感度な測定をすることができる。これらのうち、(c)の方法より(a)、(b)のほうが感度が高く好ましく、さらに(b)の方法より(a)の方法のほうが、感度がより高く好ましい。なお、これらの測定方法には、前記の本発明の化学発光測定試薬を用いることができる。

5

【0011】①の溶液と②の混液は、等量ずつ用いられるように、酸化剤、発光基質、増感剤の濃度をあらかじめ調整しておく、使用時に制約が少なく便利である。また、低温では、化学発光反応が遅いので、反応は室温（15～30℃）で行うのが好ましい。そのために①の溶液、②の混液を低温で保管している場合には、これらの試薬を反応前に室温に戻しておくことが好ましい。反応時間は、用いる増感剤の種類等により異なるが、経時的に安定した発光が得られる時間を選択する方がよい。通常は、1時間以内が好ましく、特にフェノール誘導体を増感剤に用いた場合は、20分以内が好ましい。本発明を利用できる測定対象物は、ペルオキシダーゼを直接又は標識物として用いる反応を利用するものであれば特に限定するものではないが、酵素免疫測定法との組み合わせによりamolオーダーまでの高感度測定が可能となるので、成長ホルモンやエンドセリンの測定にも好ましい方法として適用できる。また、化学発光反応はpHが高いほど発光量は増大するが、同時にペルオキシダーゼの触媒能に依存しない発光量も増大するので、両者を考慮してpH7～11の範囲で反応が行えるように試薬のpHを調整することが好ましい。

【0012】

【実施例】本発明をさらに実施例により詳述する。

実施例1

化学発光測定試薬の組成が保存安定性に及ぼす影響
化学発光測定試薬の組成が保存安定性に及ぼす影響を検討するため、以下の実験を行った。すなわち、化学発光基質の構成試薬の数を1～3とし、それぞれを37℃で一週間保管し、保管した試薬を用いた化学発光反応で発光量の変化を見ることにより、試薬の保存安定性を調べた。まず、次の4構成の試薬を調製した。

(1) 3液系

①過酸化水素溶液（4mM過酸化水素を含む50mMホウ酸ナトリウム緩衝液(pH10)）

②増感剤溶液（2mM4-[4'-(2'-メチル)チアゾリル]フェノールを含むジメチルスルホキシド）

③ルミノール溶液（20mMルミノールを含む45.5mMNaOH）

(2) 2液系A

①過酸化水素・増感剤混液（上記3液系試薬の①と②を体積比50：8の割合で混合）

②ルミノール溶液（20mMルミノールを含む45.5mMNaOH）

(3) 2液系B（本発明の試薬）

①過酸化水素溶液（4mM過酸化水素を含む50mMホウ酸ナトリウム緩衝液(pH10)）

②ルミノール・増感剤混液（上記3液系試薬の②と③を体積比8：50の割合で混合）

(4) 1液系

①過酸化水素・ルミノール・増感剤混液

6

（上記3液系試薬の①と②と③を体積比50：8：50の割合で混合）

【0013】化学発光量の測定は次の通り行った。黒色のマイクロフルオロリムーバウェル（ダイナテック社製）にペルオキシダーゼ標識抗エンドセリン抗体液（ヤマサ醤油社製）を0.1%（w/v）脱脂粉乳、0.1%（v/v）ツイーン20を含む50mMホウ酸ナトリウム緩衝液（pH10）で10万分の1に希釈した溶液）100μlを添加した。次に、上記の3液系試薬を用いる場合には①を50μl、②を8μl、③を50μlの順に約1分間隔で添加、2液系A試薬を用いる場合には①を58μl、②を50μlの順に約1分間隔で添加、2液系B試薬を用いる場合には①を50μl、②を58μlの順に約1分間隔で添加、1液系試薬を用いる場合には①を108μl添加した後、混合攪拌し10分後に、化学発光測定装置（コロナ電気社製（MLR-100））を用いて発光量を測定した。上記で1～3液系に調製した4構成の試薬を37℃で保存し、そのうちの一定量を経時的にサンプリングし、上記と同様に化学発光量を測定した。図1に化学発光測定試薬の保存日数と発光量との関係を示したが、1液系と2液系Aでは保存2日でほとんど発光が得られなくなったので、過酸化水素と増感剤、さらにルミノールとの混合により、化学発光測定試薬が急激に劣化することがわかった。一方、3液系と2液系Bは保存安定性は良好であり、過酸化水素溶液、ルミノール・増感剤混液の形で保存した場合（2液系B）は、過酸化水素、増感剤、ルミノールを分けて保存した場合（3液系）と同等以上であることがわかった。

【0014】実施例2

化学発光測定試薬の添加方法が発光量に及ぼす影響

実施例1で保存安定性が良好な化学発光測定試薬（3液系及び2液系B）の化学発光反応系への添加方法について検討した。抗エンドセリンモノクローナル抗体（ヤマサ醤油社製（MCA-ET-01））を固定化した黒色のマイクロフルオロリムーバウェル（ダイナテック社製）に、リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.2）でエンドセリン-1を種々の濃度（0～100ng/ml）に希釈した溶液200μlを注入し、24時間反応後ウェルを洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗エンドセリン抗体（ヤマサ醤油社製）の100倍希釈液を200μl注入し3時間反応させることにより、抗原抗体反応によりウェルに固定したエンドセリン-1と結合させた。洗浄後、ペルオキシダーゼを触媒とするルミノール／過酸化水素の化学発光を測定した。

【0015】測定に用いた化学発光測定試薬を次に示す。

(1) 3液系

①過酸化水素溶液（2mM過酸化水素、0.1%（w/v）脱脂粉乳、0.1%（v/v）ツイーン20を含む50mMホウ酸ナトリウム緩衝液（pH10））

50

②増感剤溶液(2mM4-[4'-(2'-メチル)チアゾリル]フェノールを含むジメチルスルホキシド)

③ルミノール溶液(20mMルミノールを含む45.5mMNaOHと50mMホウ酸ナトリウム緩衝液(pH10)の体積比1:1の混合液)

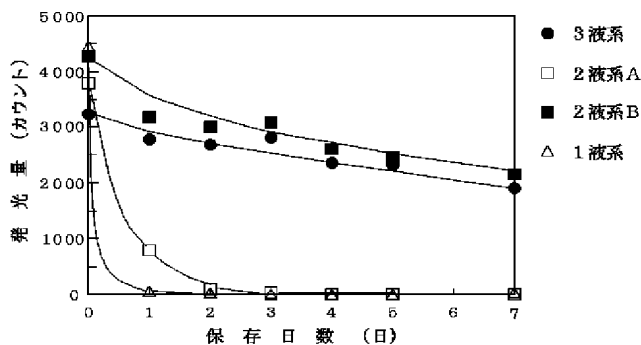
(2) 2液系

①過酸化水素溶液(2mM過酸化水素、0.1%(w/v)脱脂粉乳、0.1%(v/v)ツイーン20を含む50mMホウ酸ナトリウム緩衝液(pH10))

②ルミノール・増感剤混液(上記3液系試薬の②と③を体積比8:100の割合で混合)

【0016】測定aは3液系試薬の①を100 μ l、②を8 μ l、③を100 μ lの順に約1分間隔で添加、測定bは3液系試薬の②を8 μ l、①を100 μ l、③を100 μ lの順に約1分間隔で添加、測定cは2液系試薬の①を100 μ l、②を108 μ lの順に約1分間隔で添加、測定dは2液系試薬の①100 μ lと②108 μ lを別々にかつ同時に添加、測定eは2液系試薬の①と②を体積比100:108の割合で使用直前に混合したものを208 μ l添加した後、混合攪拌し10分後に、化学発光測定装置(コロナ電気社製(MLR-100))を用いて発光量を測定した。図2にエンドセリン-1濃度と発光量との関係を示したが、増感剤溶液を第

【図1】



一番目に添加した測定bではほとんど発光が得られなかった。その他の測定では、エンドセリン-1 30ng/ml以上で発光量は一定となるが矛盾のない良好な発光量が得られた。また、化学発光量は測定c、測定d、測定e、測定aの順で大きかった。

【0017】

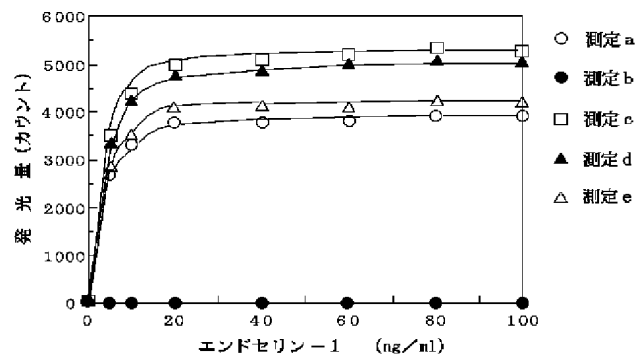
【発明の効果】本発明の化学発光測定試薬は、試薬キットの構成が簡素化されると共に保存安定性に優れる。また、この測定試薬を用いる本発明の化学発光測定方法は、発光量が高く、高感度の測定が可能である。従って、酵素免疫測定法、DNAプローブ法等による生体微量成分の定量・分析等、臨床検査や臨床化学の分野で広範囲に利用できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】横軸に化学発光測定試薬の保存日数、縦軸にそれぞれの試薬を用いた化学発光反応で定量された発光量を示し、化学発光測定試薬の保存安定性を表すグラフである。発光量の1カウントは、 1.2×10^{-16} Wである。

【図2】横軸にエンドセリン-1濃度、縦軸に発光量を示し、化学発光試薬の添加方法と発光量との関係を表すグラフである。発光量の1カウントは、 1.2×10^{-16} Wである。

【図2】



PAT-NO: JP408051997A
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 08051997 A
TITLE: REAGENT FOR MEASUREMENT OF CHEMILUMINESCENCE AND METHOD
FOR MEASUREMENT OF CHEMILUMINESCENCE
PUBN-DATE: February 27, 1996
INVENTOR-INFORMATION: IWATA, MASAKO; HAYASHI, TAKASHI; YAMAKI, MITSUO
ASSIGNEE-INFORMATION: HITACHI CHEM CO LTD
APPL-NO: JP06161638
APPL-DATE: July 14, 1994
INT-CL (IPC): C12Q001/28
ABSTRACT:

PURPOSE: To provide a reagent for measurement of chemiluminescence, capable of simplifying constitution of a reagent kit, excellent in shelf life, enabling a high-emission and high-sensitivity measurement in chemiluminescence measurement and, accordingly, useful for the wide-ranging purposes in the fields of, e.g. quantitative analysis of biological minor components by the enzyme immunoassay method, the DNA probe method, etc., clinical examination and clinical chemistry.

CONSTITUTION: This reagent for measurement of chemiluminescence is a reagent for detecting and quantitatively analyzing the activity of an enzyme by a chemiluminescence reaction between a chemiluminescence substrate and an oxidizing agent in the presence of peroxidase as the enzyme and a sensitizer. This reagent is stored in the form of a two pack type reagent composed of (1) an oxidizing agent solution containing a chemiluminescence substrate, an oxidizing agent and a sensitizer and (2) a mixture solution of a chemiluminescence substrate and a sensitizer. A chemiluminescence measurement method carried out by using this reagent is also provided.

CLAIM + DETAILED DESCRIPTION

[Claim(s)]

[Claim 1] [using peroxidase as an enzyme / with the chemiluminescence reaction using a chemiluminescence substrate, an oxidizing agent, and a sensitizer] The chemiluminescence measuring reagent which are detection and a measuring reagent made a fixed quantity about the activity of an enzyme, and saves a chemiluminescence substrate, an oxidizing agent, and a sensitizer as 2 liquid of ** oxidizing agent solution, and ** chemiluminescence substrate and sensitizer mixture.

[Claim 2] The chemiluminescence measuring reagent according to claim 1 whose chemiluminescence substrates are luminol.

[Claim 3] The chemiluminescence measuring reagent according to claim 1 or 2 whose oxidizing agent is hydrogen peroxide.

[Claim 4] [using peroxidase as an enzyme / with the chemiluminescence reaction using a chemiluminescence substrate, an oxidizing agent, and a sensitizer] The chemiluminescence measuring method characterized by adding in order of ** oxidizing agent solution, and ** chemiluminescence substrate and sensitizer mixture to the system of reaction which are detection and the measuring method made a fixed quantity about the activity of an enzyme, prepares 2 liquid of ** oxidizing agent solution, and ** chemiluminescence substrate and sensitizer mixture beforehand, and contains peroxidase.

[Claim 5] [using peroxidase as an enzyme / with the chemiluminescence reaction using a chemiluminescence substrate, an oxidizing agent, and a sensitizer] The chemiluminescence measuring method characterized by being detection and the measuring method made a fixed quantity about the activity of an enzyme, preparing 2 liquid of ** oxidizing agent solution, and ** chemiluminescence substrate and sensitizer mixture beforehand, and adding these to the system of reaction which contains peroxidase separately and simultaneous.

[Claim 6] [using peroxidase as an enzyme / with the chemiluminescence reaction using a

chemiluminescence substrate, an oxidizing agent, and a sensitizer] The chemiluminescence measuring method characterized by being detection and the measuring method made a fixed quantity about the activity of an enzyme, preparing 2 liquid of ** oxidizing agent solution, and ** chemiluminescence substrate and sensitizer mixture beforehand, mixing these just before use, and adding to the system of reaction containing peroxidase.

[Claim 7] The chemiluminescence measuring method according to claim 4, 5, or 6 whose chemiluminescence substrates are luminol.

[Claim 8] The chemiluminescence measuring method according to claim 4, 5, 6, or 7 whose oxidizing agent is hydrogen peroxide.

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the chemiluminescence measuring reagent useful in detection, a fixed quantity, etc. and chemiluminescence measuring method of a specific ligation reaction, for example, an antigen-antibody reaction, biologically. especially -- the field of a clinical laboratory test and clinical chemistry etc. -- a living body minor constituent -- high -- it is related with a chemiluminescence measuring reagent useful in sensitivity analysis and fixed quantity, and a chemiluminescence measuring method.

[0002]

[Description of the Prior Art] Using the specific ligation reaction which used specific scavengers, such as an antigen, an antibody, and an acceptor, for high sensitivity for the measuring object substance in order to carry out a fixed quantity, detection and is known, and sandwiched type immunoassay is known by the typical measuring method. As a substance for detection of said ligation reaction, radioactive isotope, an enzyme, a fluorescence substance, a luminescent substance, etc. can be used. [among these / the immunoassay (EIA) using an enzyme as a substance for detection] There is no danger like the immunoassay (RIA) using radioactive isotope, and a specific ligation reaction can be amplified, and since the measuring object amount of substance specifically combined by generally carrying out a fixed quantity of catalytic activity of the enzyme can be measured indirectly, it is used widely. [the method of using peroxidase as an enzyme and measuring this enzyme activity using the chemiluminescence reaction by luminol and hydrogen peroxide] although luminescence is usually a short life span if the increase in the amount of luminescence and protraction of luminescence temporal duration can be attained and this reaction is used by addition of a sensitizer, it is equal to RIA -- high -- it is known that sensitivity measurement will be attained. Therefore, various sensitizers are examined (JP,S59-171839,A, JP,S59-500252,A, JP,H2-291299,A, etc.).

[0003]

[Problem to be solved by the invention] As the composition of a reagent, and a mixed order of reaction time, [above-mentioned JP,S59-171839,A and JP,S59-500252,A] Saving as a reagent of peroxidase, luminol, a sensitizer, and an oxidizing agent separate in four, mixing to reaction time, and making a luminescence reaction start is indicated. The method of pouring into the system of reaction containing a peroxidase antibody complex, and making a reaction start of having mixed luminol and hydrogen peroxide, having prepared the solution and having still more specifically added the sensitizer for this beforehand several hours before use is indicated. Moreover, to above-mentioned JP,H2-291299,A, the method of adding the mixed liquor which mixed luminol and hydrogen peroxide solution about 2 hours before use, added the sensitizer further and was mixed just before use to the system of reaction is indicated. The measuring object substance with which the measuring method using these chemiluminescence reactions is generally applied is sometimes a super-minute amount plentifully, and development of the reagent the describing [above] all directions method of a reagent is not necessarily enough and stable measuring method which is high sensitivity further and preservation stability of a reagent are high is desired. This invention solves these technical problems and offers the measuring

reagent and measuring method which could be made as a result of inquiring wholeheartedly and with which it is high sensitivity further, and a stable measuring method and preservation stability can also attain simplification of a reagent kit highly from the composition of a reagent, and a point of an addition order.

[0004]

[Means for solving problem] That is, this invention relates to following (1) - (4).

(1) [using peroxidase as an enzyme / with the chemiluminescence reaction using a chemiluminescence substrate, an oxidizing agent, and a sensitizer] The chemiluminescence measuring reagent which are detection and a measuring reagent made a fixed quantity about the activity of an enzyme, and saves a chemiluminescence substrate, an oxidizing agent, and a sensitizer as 2 liquid of ** oxidizing agent solution, and ** chemiluminescence substrate and sensitizer mixture.

(2) [using peroxidase as an enzyme / with the chemiluminescence reaction using a chemiluminescence substrate, an oxidizing agent, and a sensitizer] The chemiluminescence measuring method characterized by adding in order of ** oxidizing agent solution, and ** chemiluminescence substrate and sensitizer mixture to the system of reaction which are detection and the measuring method made a fixed quantity about the activity of an enzyme, prepares 2 liquid of ** oxidizing agent solution, and ** chemiluminescence substrate and sensitizer mixture beforehand, and contains peroxidase.

(3) [using peroxidase as an enzyme / with the chemiluminescence reaction using a chemiluminescence substrate, an oxidizing agent, and a sensitizer] The chemiluminescence measuring method characterized by being detection and the measuring method made a fixed quantity about the activity of an enzyme, preparing 2 liquid of ** oxidizing agent solution, and ** chemiluminescence substrate and sensitizer mixture beforehand, and adding these to the system of reaction which contains peroxidase separately and simultaneous.

(4) [using peroxidase as an enzyme / with the chemiluminescence reaction using a chemiluminescence substrate, an oxidizing agent, and a sensitizer] The chemiluminescence measuring method characterized by being detection and the measuring method made a fixed quantity about the activity of an enzyme, preparing 2 liquid of ** oxidizing agent solution, and ** chemiluminescence substrate and sensitizer mixture beforehand, mixing these just before use, and adding to the system of reaction containing peroxidase.

[0005] If the chemiluminescence measuring reagent and chemiluminescence measuring method in this invention use a chemiluminescence substrate, an oxidizing agent, and a sensitizer for detection and the fixed quantity of enzyme activity, using peroxidase as an enzyme, there will be no restriction in particular in a measuring object and the measurement procedure. For example, it is considered as the specific binding system of reaction using peroxidase as marker enzyme, and can use for various analytical methods, such as a 1 antibody technique [of enzyme immunoassay], double antibody technique, competition analytical method, sandwiches analytical method, homogeneous analytical method, heterogeneous analytical method, and Western analytical method, and a DNA probe method.

[0006] Although the peroxidase in particular used by this invention is not limited, the basic isozyme of horseradish peroxidase is suitable for it from the point that the high amount of unique luminescence is obtained with combination with a sensitizer. Although each mold of B, C, D, and E is known by the basic isozyme of horseradish peroxidase, in these, C type is the most desirable in respect of RZ value (the ratio of hemin to protein is shown), and enzyme activity. This is marketed, for example from Toyobo Co., Ltd., and is available.

[0007] Although there are luminol, lucigenin, etc. as a chemiluminescence substrate used for a chemiluminescence reaction luminol is desirable -- concrete -- luminol, iso luminol, N-ethyl iso luminol, and N-(4-amino butyl)- N-ethyl iso luminol HEMISAKUSHIMIDO and N-(6-amino hexyl)- N-ethyl iso luminol etc. is mentioned. Luminol or iso luminol is desirable and especially luminol is especially desirable. Since hydrazine and sulfide ion which are a manufacture raw material are mixed in the thing of the reagent grade which can usually be obtained in many cases, as for luminol, it is desirable to use

what repeated and refined recrystallization.

[0008] Hydrogen peroxide is desirable although hydrogen peroxide, boron acid chloride, urea peroxide, etc. are mentioned as an oxidizing agent used for a chemiluminescence reaction. [especially if the sensitizer used for a chemiluminescence reaction has the extra train light effect and the luminescence lasting effect, do not limit, but] p-iodine phenol, p-bromine phenol, phenol indophenol, Phenol derivatives, such as 4-[4'-(2'-methyl) thiazolyl] phenol, Benzothiazole derivatives, such as 6-hide ROKISHI benzothiazole and 4-(4-hydroxyphenyl) thiazole, 3 -(10-FENO thiazyl)- Propyl sulfonate, p-hydroxyphenylpropionic acid, diethylaniline, etc. are used as a desirable thing. Especially a desirable thing is 4-[4'-(2'-methyl) thiazolyl] phenol at the point that a S/N ratio (ratio of a signal to a noise) is high.

[0009] The chemiluminescence measuring reagent of this invention saves the substance which participates in chemiluminescence as 2 liquid of ** oxidizing agent solution, and ** chemiluminescence substrate and sensitizer mixture. Thus, since it is not necessary to save a chemiluminescence substrate like before as a 3 liquid system of ** oxidizing agent solution, ** chemiluminescence substrate solution, and ** sensitizer solution if saved When there are few reagents which can simplify the composition of a reagent kit and can be applied to the automatic pipetting device of measuring equipment attachment, the preservation stability of a convenient top is also 3 liquid system and more than equivalent, and it may excel. In order to raise the S/N ratio of stability or a luminous reaction, as for an oxidizing agent solution, it is desirable to use for a buffer solution as a solvent the solution which added antiseptics, a surface active agent, protein, etc. Especially if the concentration of an oxidizing agent is concentration where high luminescence is obtained and which does not require substrate inhibition, it is not limited, but its 0.1 in solution - 10mM is desirable. In order to obtain stable luminescence, as for a chemiluminescence substrate and a sensitizer solution, it is desirable that it is pH eight to 13 alkalinity. Sensitizer concentration is not limited especially if high luminescence of a S/N ratio is obtained, but its range of 0.01 in solution - 5mM is desirable. Especially if luminescence substrate concentration is concentration where high luminescence is obtained and which does not require substrate inhibition, it is not limited, but the range of 0.01 in solution - 50mM is desirable.

[0010] The chemiluminescence measuring method of this invention the substance which participates in chemiluminescence beforehand ** oxidizing agent solution, ** [the system of reaction which prepares as 2 liquid of a chemiluminescence substrate and sensitizer mixture, and contains (a) peroxidase] ** Add the solution of (b) **, and the mixture of ** to the system of reaction which adds in order of a solution and the mixture of **, or contains peroxidase separately and simultaneous, or mix 2 liquid of the solution of (c) **, and the mixture of ** just before use, and add to the system of reaction containing peroxidase. by taking these methods, the amount of chemiluminescence is large compared with the conventional method -- high -- sensitivity measurement can be carried out. (a) and the (b) have sensitivity highly more desirable than the method of (c), and the method of (a) has [among these] sensitivity more highly more desirable still than the method of (b). In addition, the chemiluminescence measuring reagent of aforementioned this invention can be used for these measuring methods.

[0011] ** An equivalent amount of solutions and mixtures of ** have convenient restrictions few at the time of use, if you adjust the concentration of the oxidizing agent, the luminescence substrate, and the sensitizer beforehand so that it may be used every. Moreover, it is desirable that a room temperature (15-30 degrees C) performs a reaction at low temperature since the chemiluminescence reaction is slow. Therefore, when the solution of ** and the mixture of ** are being kept at low temperature, it is desirable to return these reagents to a room temperature, before reacting. Although the reaction time changes with kinds of sensitizer to be used etc., it is better to choose the time when luminescence stabilized temporally is obtained. Usually, less than 1 hour is desirable, and when especially a phenol derivative is used for a sensitizer, less than 20 minutes is desirable. [especially if the reaction which uses peroxidase as a direct or label thing is used, do not limit the measuring object thing which can use this invention, but] Since the high sensitivity measurement to an amol order becomes possible with

combination with enzyme immunoassay, it is applicable also to measurement of a growth hormone or endothelin as a desirable method. Moreover, the amount of luminescence increases so that a chemiluminescence reaction has high pH, but since the amount of luminescence for which it does not depend on the catalyst ability of peroxidase simultaneously also increases, it is desirable to adjust pH of a reagent so that it can react in pH seven to 11 in consideration of both.

[0012]

[Working example] This invention is further explained in full detail according to a work example. The following experiments were conducted in order to consider the influence the presentation of an influence chemiluminescence measuring reagent which the presentation of a work-example 1 chemiluminescence measuring reagent exerts on preservation stability has on preservation stability. That is, the preservation stability of the reagent was investigated by setting the number of the composition reagents of a chemiluminescence substrate to 1-3, keeping each for one week at 37 degrees C, and seeing change of the amount of luminescence at the chemiluminescence reaction using the kept reagent. First, the reagent of the following 4 composition was prepared.

(1) 3 liquid system ** hydrogen peroxide solution (50mM sodium-borate buffer solution containing 4mM hydrogen peroxide (pH 10))

** Sensitizer solution (dimethyl sulfoxide containing 2mM4-[4'-(2'-methyl) thiazolyl] phenol)

** Luminol solution (45.5mMNaOH containing 20mM luminol)

(2) 2 liquid system A** hydrogen peroxide and sensitizer mixture (** and ** of the above-mentioned 3 liquid system reagent are mixed at a rate of a volume ratio 50:8)

** Luminol solution (45.5mMNaOH containing 20mM luminol)

(3) 2 liquid system B (reagent of this invention)

** Hydrogen peroxide solution (50mM sodium-borate buffer solution containing 4mM hydrogen peroxide (pH 10))

** Luminol and sensitizer mixture (** and ** of the above-mentioned 3 liquid system reagent are mixed at a rate of a volume ratio 8:50)

(4) 1 liquid system ** hydrogen peroxide, luminol, and sensitizer mixture (**, **, and ** of the above-mentioned 3 liquid system reagent are mixed at a rate of a volume ratio 50:8:50)

[0013] Measurement of the amount of chemiluminescence was performed as follows. Peroxidase labelling anti-endothelin antibody liquid (made by a YAMASA soy sauce company) to black micro fluoro RIMOBAWERU (made by Dynatech) 0.1% (w/v) skim milk powder, 100micro of solutions 1 diluted with 50mM sodium-borate buffer solution (pH 10) which contains Tween 20 0.1% (v/v) to 1/100,000 were added. In using the above-mentioned 3 liquid system reagent, for ** 50microl and ** Next, 8microl, In using addition and a 2 liquid system A reagent at intervals of about 1 minute in order of 50microl, ** ** 58microl, In using addition and a 2 liquid system B reagent at intervals of about 1 minute in order of 50microl, ** ** 50microl, ** When addition and 1 liquid system reagent are used at intervals of about 1 minute in order of 58microl, after doing 108microl addition of **, mixed churning was carried out, 10 minutes afterward, chemiluminescence measuring apparatus (made by Corona Electric Co., Ltd. (MLR-100)) was used, and the amount of luminescence was measured. The reagent of 4 composition prepared in 1 - 3 liquid system above was saved at 37 degrees C, a fixed quantity of them was sampled temporally, and the amount of chemiluminescence was measured like the above. Although the relation between the preservation days of a chemiluminescence measuring reagent and the amount of luminescence was shown in drawing 1, since luminescence was no longer obtained hardly by 1 liquid system and 2 liquid system A in preservation two days, mixing with luminol showed further hydrogen peroxide, a sensitizer, and that a chemiluminescence measuring reagent deteriorated rapidly. On the other hand, the preservation stability of 3 liquid system and 2 liquid system B was good, and when saved in the form of a hydrogen peroxide solution, and luminol and sensitizer mixture (2 liquid system B), it turned out that it is the case (3 liquid system) where hydrogen peroxide, a sensitizer, and luminol are divided and saved, and more than equivalent.

[0014] Preservation stability considered the addition method to the chemiluminescence system of reaction of a good chemiluminescence measuring reagent (3 liquid system and 2 liquid system B) in the influence work example 1 which the addition method of a work-example two-generations study luminescence measuring reagent exerts on the amount of luminescence. [black micro fluoro RIMOBAWERU (made by Dynatech) which fixed the anti-endothelin monoclonal antibody (made by a YAMASA soy sauce company (MCA ET-01))] 200micro of solutions 1 which diluted endothelin 1 with the sodium phosphate buffer solution (pH 7.2) to various concentration (zero to 100 ng/ml) are poured in. It was made to combine with the endothelin 1 fixed to WERU by the antigen-antibody reaction by washing WERU after a 24-hour reaction, doing 200microl pouring of the 100 time diluent of a peroxidase labelling anti-endothelin antibody (made by a YAMASA soy sauce company), and making it react for 3 hours. The chemiluminescence of the luminol/hydrogen peroxide which makes peroxidase a catalyst was measured after washing.

[0015] The chemiluminescence measuring reagent used for measurement is shown below.

(1) 3 liquid system ** hydrogen peroxide solution (2mM hydrogen peroxide, 0.1% (w/v) skim milk powder, 50mM sodium-borate buffer solution that contains Tween 20 0.1% (v/v) (pH 10))

** Sensitizer solution (dimethyl sulfoxide containing 2mM4-[4'-(2'-methyl) thiazolyl] phenol)

** Luminol solution (mixed liquor of the volume ratio 1:1 of 45.5mMNaOH containing 20mM luminol and 50mM sodium-borate buffer solution (pH 10))

(2) 2 liquid system ** hydrogen peroxide solution (2mM hydrogen peroxide, 0.1% (w/v) skim milk powder, 50mM sodium-borate buffer solution that contains Tween 20 0.1% (v/v) (pH 10))

** Luminol and sensitizer mixture (** and ** of the above-mentioned 3 liquid system reagent are mixed at a rate of a volume ratio 8:100)

[0016] Measurement a adds 100microl and ** by 8microl, and it adds ** for ** of 3 liquid system reagent at intervals of about 1 minute in order of 100microl. Measurement b adds 8microl and ** by 100microl, and it adds ** for ** of 3 liquid system reagent at intervals of about 1 minute in order of 100microl. Measurement c adds ** of 2 liquid system reagent by 100microl, and it adds ** at intervals of about 1 minute in order of 108microl. Measurement d adds **100micro l and**108microl of 2 liquid system reagent separately and simultaneous. After Measurement e did 208microl addition of what mixed ** and ** of 2 liquid system reagent at a rate of the volume ratio 100:108 just before use, mixed churning was carried out, and 10 minutes afterward, it used chemiluminescence measuring apparatus (made by Corona Electric Co., Ltd. (MLR-100)), and measured the amount of luminescence. Although the relation between endothelin 1 concentration and the amount of luminescence was shown in drawing 2 , in the measurement b which added the sensitizer solution to the first, luminescence was hardly obtained. By other measurement, it is endothelin 1. Although it became constant [the amount of luminescence] more than by 30 ng/ml, the good amount of luminescence without inconsistency was obtained. Moreover, the amount of chemiluminescence was large in order of Measurement c, Measurement d, Measurement e, and Measurement a.

[0017]

[Effect of the Invention] The chemiluminescence measuring reagent of this invention is excellent in preservation stability while the composition of a reagent kit is simplified. Moreover, the chemiluminescence measuring method of this invention using this measuring reagent has the high amount of luminescence, and measurement of high sensitivity is possible for it. Therefore, the fixed quantity, analysis, etc. of the living body minor constituent by enzyme immunoassay, a DNA probe method, etc. can be broadly used in the field of a clinical laboratory test or clinical chemistry.